

JP99 103909 22.07.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

EJKU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 8月 7日

REC'D 13 SEP 1999

WIPO PCT

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第225060号

出 願 人
Applicant(s):

財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所
武田薬品工業株式会社

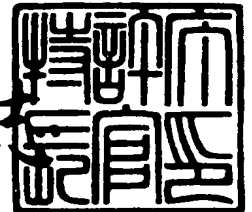
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月12日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 建 彦



出証番号 出証特平11-3056622

【書類名】 特許願

【整理番号】 A98146

【提出日】 平成10年 8月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/10
C07K 14/435
C12Q 1/00

【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

【請求項の数】 16

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市請西2丁目20番25号

【氏名】 小原 収

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市清見台南5丁目1番26号 オータニガーデンハウスB-4

【氏名】 長瀬 隆弘

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市八幡台5丁目2番11号

【氏名】 野村 信夫

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日1丁目7番地の9 武田春日ハイツ
1402号

【氏名】 日沼 州司

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日1丁目7番地の9 武田春日ハイツ
303号

【氏名】 藤井 亮

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日2丁目36番地の3 402号

【氏名】 北原 治

【特許出願人】

【識別番号】 596175810

【氏名又は名称】 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所

【代表者】 平岩 外四

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代表者】 武田 國男

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第207579号

【出願日】 平成10年 7月23日

【整理番号】 A98122

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000052

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質およびその DNA

【特許請求の範囲】

【請求項 1】配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

【請求項 2】請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 3】請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA を含有する DNA。

【請求項 4】配列番号：2 または配列番号：4 で表される塩基配列を有する請求項 3 記載の DNA。

【請求項 5】請求項 3 記載の DNA を含有する組換えベクター。

【請求項 6】請求項 5 記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項 7】請求項 6 記載の形質転換体を培養し、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。

【請求項 8】請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項 9】請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

【請求項 10】請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 11】請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる

化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項12】請求項10記載のスクリーニング方法または請求項11記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

【請求項13】請求項10記載のスクリーニング方法または請求項11記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項14】請求項3記載のDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項15】請求項3または請求項4記載のDNAの塩基配列の一部を含有してなるオリゴヌクレオチド。

【請求項16】請求項3または請求項4記載のDNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト脳由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードするDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】

多くのホルモンや神経伝達物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質の多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質と総称される。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在

し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

【0003】

例えば、脳などの中枢神経系の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる調節のもとで脳の生理的な機能の調節が行なわれている。特に、神経伝達物質は脳内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。脳内には未だ未知の神経伝達物質も多く、そのレセプター蛋白質をコードするcDNAの構造に関しても、これまで報告されていないものも多いと考えられる。さらに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在するかどうかについても分かっていなかった。

脳における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、脳内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST)としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ヒト脳由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチ

ドをコードするDNAを含有するDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、該G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩、およびリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト脳由来の新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを単離し、全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0006】

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(2) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、

(3) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(4) 配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列で表される塩基配

列を有する第(3)項記載のDNA、

(5) 第(4)項記載のDNAを含有する組換えベクター、

(6) 第(7)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、

(7) 第(8)項記載の形質転換体を培養し、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、

【0007】

(8) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、

(9) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

(10) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩をスクリーニングする方法、

(11) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩含有することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(12) 第(10)項記載のスクリーニング方法または第(11)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(13) 第(10)項記載のスクリーニング方法または第(11)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(14) 第(3)項記載のDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダ

イズするDNA、

(15) 第(3)項または第(4)項記載のDNAの塩基配列の一部を含有してなるオリゴヌクレオチド、および

(16) 第(3)項または第(4)項記載のDNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるオリゴヌクレオチドなどを提供する。

【0008】

より具体的には、

(17) 蛋白質が、①配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(18) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする第(9)項記載のリガンドの決定方法、

(19) リガンドがアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボ

キサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンである第(15)項記載のリガンドの決定方法、

【0009】

(20) (i) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、(ii) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする第(10)項記載のスクリーニング方法、

(21) (i) 標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(22) (i) 標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(23) (i) 標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0010】

(24) (i) 標識したリガンドを第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(25) (i) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(26) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形

質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0011】

(27) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンである第(25)項または第(26)項記載のスクリーニング方法、

(28) 第(17)項～第(24)項記載のスクリーニング方法で得られる、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(29) 第(20)項～第(27)項記載のスクリーニング方法で得られる、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させるの化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

【0012】

(30) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする第(11)項記載のスクリーニング用キット、

(31) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする第(11)項記載のスクリーニング用キット、

(32) 第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有することを特徴とする第(11)項記載のスクリーニング用キット、

(33) 第(30)項～第(32)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(34) 第(30)項～第(32)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

(35) 第(8)項記載の抗体と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩とを接触させることを特徴とする第(1)項のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、

(36) 第(8)項記載の抗体と、被検液および標識化された第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、および

(37) 被検液と担体上に不溶化した第(8)項記載の抗体および標識化された第(8)項記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の第(1)項記載のG蛋白

質共役型レセプター蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法などを提供する。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質(以下、レセプター蛋白質と略記する場合がある)は、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列〔図1および図2中のアミノ酸配列〕または配列番号:3で表わされるアミノ酸配列〔図4および図5中のHK05490で表されるアミノ酸配列;図7~図15中のアミノ酸配列〕と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる細胞(例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髓細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)や血球系の細胞(例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳室、黒質)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など(特に、脳や脳の各部位)に由来するタンパク質であってもよく、

また合成タンパク質であってもよい。

【0014】

配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

【0015】

また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは

数個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

【0016】

本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号:1または配列番号:3で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプタータンパク質は、C末端が通常カルボキシル基($-\text{COOH}$)またはカルボキシレート($-\text{COO}^-$)であるが、C末端がアミド($-\text{CONH}_2$)またはエステル($-\text{COOR}$)であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプタータンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号:1または配

列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）のレセプター蛋白質などが用いられる。

【0017】

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、〔図3〕または〔図6〕で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

【0018】

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、よ

り好ましくは数個、さらい好ましくは1～5個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基($-\text{COOH}$)またはカルボキシレート($-\text{COO}^-$)であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド($-\text{CONH}_2$)またはエステル($-\text{COOR}$)であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のレセプター蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基($-\text{COOH}$)またはカルボキシレート($-\text{COO}^-$)であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド($-\text{CONH}_2$)またはエステル($-\text{COOR}$)であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

【0019】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマ

トグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製単離することができる。

【0020】

本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0021】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化

水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ～ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

【0022】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また

、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0023】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0024】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。

タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

【0025】

本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0026】

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、前述した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基

配列と約70以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0027】

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるオリゴヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・オリゴヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたオリゴヌクレオチド（核酸）は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質共役型レセ

プター蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的なオリゴヌクレオチド、及びG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドは、生体内及び生体外でG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

【0028】

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なオリゴヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリナグや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、

1 個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーL-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、項とのプリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば 1 個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0029】

本発明のアンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており。例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Cro

oke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリッピド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸其れ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0030】

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細

胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または②配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質ペプチドと実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列と約70以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0031】

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド（以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のレセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプター蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0032】

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutantTM-G（宝酒造（株

))、MutantTM-K(宝酒造(株))などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたレセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0033】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロ

モーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0034】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0035】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. U S

A), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)]などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)]などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (*Saccaromyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccaromyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、サッカロマイセス ピキア パストリス (*Saccaromyces picjia pastoris*)などが用いられる。

【0036】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記), マウスL

細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

【0037】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新 細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、

無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

【0038】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0039】

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約

3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)]などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることができる。

【0040】

上記培養物から本発明のレセプター蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にレセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロ

マトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0041】

かくして得られるレセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するレセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のレセプター蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0042】

本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のレセプター蛋白質等と略記する）に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0043】

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のレセプター蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG(好ましくは、PEG1000～PEG6000)が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0044】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質等抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる

細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地 (和光純薬工業 (株)) またはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0045】

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法 [例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 (例、DEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法] に従って行なうことができる。

【0045】

[ポリクローナル抗体の作製]

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原 (レセプター蛋白質等抗原) とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と

同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0047】

本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、①本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーを

作成するための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。

特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のレセプター蛋白質、部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のレセプタータンパク質等と略記する場合がある）、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。

【0048】

（1）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定方法

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシト

ニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パングレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTES など)、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パングレアティックポリペプチドまたはガラニンなど)の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

【0049】

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性)を有する化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

【0050】

より具体的には、本発明は、①標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペ

チドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質またはその塩に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

【0051】

④試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

【0051】

まず、リガンド決定方法に用いるレセプター蛋白質としては、前記した本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該レセプター蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

【0053】

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分 ~ 10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分 ~ 2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0054】

該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の① ~ ③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリ

ン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなどが好適である。

【0055】

具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜面分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分

から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が0 c p mを越える試験化合物を本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド(アゴニスト)として選択することができる。

【0056】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の④～⑤の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0057】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] など で標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100~1000倍濃い濃度に調製する。

【0058】

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5 μ l加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定

する。

【0059】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスチナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが用いられる。

【0060】

（2）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記（1）の方法において、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを本発明のレセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、（イ）本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけ

るレセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0061】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方すること

ができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0062】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0063】

（3）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物

(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミクス(Genomics), 第5巻, 874~879頁(1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー(Proceedings of the Natinal Academy of Sciences of the United States of America), 第86巻, 2766~2770頁(1989年))などにより実施することができる。

【0064】

(4) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明のレセプター蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

【0065】

(5) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明のレセプター蛋白質等を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物

(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など) またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、(イ) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を有する化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト)、(ハ) リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ) リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる(なお、上記(イ)の化合物は、前記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい)。

すなわち、本発明は、(i) 本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドとを接触させた場合と(ii) 本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) と(ii) の場合における、例えば、該レセプター蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

【0066】

より具体的には、本発明は、

① 標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0067】

④本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現し

た本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0068】

本発明のレセプター蛋白質等が得られる以前は、G 蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどの G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後に該候補化合物が実際にヒトの G 蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドと G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡単に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプター蛋白質等としては、前記した本発明のレセプター蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質等などが適している。

【0069】

本発明のレセプター蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等であってもよいし、該レセプター蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

【0070】

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン

(Kinematica社製)のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速(500rpm~3000rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~30000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質等を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0071】

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①~③を実施するためには、例えば、適当なレセプター蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたりガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリ

ガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml～10 mlの該レセプター溶液に、一定量（5000 cpm～50000 cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に 10^{-4}M ～ 10^{-10}M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0072】

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質等を含む細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収し

て、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型レセプター蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0073】

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10⁵個／穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの

③標識リガンド

市販の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したリガンド 水溶液の状態のものを 4°C あるいは -20°C にて保存し、用時に測定用緩衝液にて $1\ \mu\text{M}$ に希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを 0.1% ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含む PBS で $1\ \text{mM}$ となるように溶解し、 -20°C で保存する。

【0074】

2. 測定法

① 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現 CHO 細胞を、測定用緩衝液 $1\ \text{ml}$ で2回洗浄した後、 $490\ \mu\text{l}$ の測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3}\sim 10^{-10}\ \text{M}$ の試験化合物溶液を $5\ \mu\text{l}$ 加えた後、標識リガンドを $5\ \mu\text{l}$ 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに $10^{-3}\ \text{M}$ のリガンドを $5\ \mu\text{l}$ 加えておく。

③ 反応液を除去し、 $1\ \text{ml}$ の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを $0.2\ \text{N}\ \text{NaOH}-1\%\ \text{SDS}$ で溶解し、 $4\ \text{ml}$ の液体シンチレーター A (和光純薬製) と混合する。

④ 液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

【0075】

〔数1〕

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B_0 : 最大結合量

【0076】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を變化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

【0077】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のDNAを含有する医薬と同様に、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0078】

(6) 本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化レセプター蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプター蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法、

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法を提供

する。

上記(ii)においては、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

【0079】

本発明のレセプター蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のレセプター蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、レセプター蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0080】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、

蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるレセプター蛋白質等の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプター蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、レセプター蛋白質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

【 0 0 8 1 】

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（Ｆ）と抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ，Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体と

して固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0082】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー(Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白

質またはその塩を感度良く定量することができる。さらに、本発明の抗体を用いて本発明のレセプター蛋白質またはその塩を定量することによって、各種疾病の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプター蛋白質等を検出するために使用することができる。また、本発明のレセプター蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のレセプター蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明のレセプター蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0083】

(7) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明のレセプター蛋白質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げれるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプター蛋白質等を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

【0084】

受精卵細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞

において本発明のレセプター蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する。

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明のDNAが転移された動物は、本発明のレセプター蛋白質等が高発現させられているので、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプター蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプター蛋白質等について分析することができる。本発明のレセプター蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプター蛋白質等を単離精製することも可能である。

【0085】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0086】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン

P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸
M e	: メチル基
E t	: エチル基
B u	: ブチル基
P h	: フェニル基
T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

【0087】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

T o s	: p-トルエンスルフォニル
C H O	: ホルミル
B z l	: ベンジル
C l ₂ Bz l	: 2, 6-ジクロロベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
C l-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
B r-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
B o c	: t-ブトキシカルボニル
D N P	: ジニトロフェノール
T r t	: トリチル
B u m	: t-ブトキシメチル
F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

HOOBt : 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-
1,2,3-ベンゾトリアジン
HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
DCC : N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0088】

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕

配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列を示す。

【0089】

後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/pHK05006は、平成10年7月21日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-6433として、平成10年7月8日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16189として寄託されている。

後述の実施例2で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/pHK05490は、平成10年8月7日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-6456として寄託されている。

【0090】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範

囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

【0091】

実施例 1

ヒト脳由来の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の探索と塩基配列の決定 (1)
DNA リサーチ (DNA RESEARCH) 第 4 巻、第 53-59 頁 (1997 年) に記載の方法またはそれに準じた方法に基づいて得られた cDNA にコードされるアミノ酸配列に対して、既知の受容体の配列；特にヒト ORF 受容体配列を鋳型にしてホモロジーサーチをしたところ、配列番号：1 (図 1 および図 2 中のアミノ酸配列) で表されるアミノ酸配列が相同性を示した。

次に配列番号：1 (図 1 および図 2 中のアミノ酸配列) でアミノ酸配列に相当する cDNA を配列解析したところ、配列番号：2 (図 1 および図 2 中の塩基配列) のようになった。その疎水性プロットは図 3 のようになり、7 回膜貫通型 (G 蛋白質共役型) のレセプターをコードしていることが判明した。

さらに、配列番号：2 で表される DNA を保持するプラスミド pHK05006 を E. coli JM109 に導入して E. coli JM109/pHK05006 を得た。

【0092】

実施例 2

ヒト脳由来の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の探索と塩基配列の決定 (2)
DNA リサーチ (DNA RESEARCH) 第 4 巻、第 53-59 頁 (1997 年) に記載の方法またはそれに準じた方法に基づいて得られた cDNA [配列番号：4 (図 7～図 15 中の DNA 配列)] にコードされるアミノ酸配列に対して、既知の受容体の配列；特にヒト ORF 受容体配列を鋳型にしてホモロジーサーチをしたところ、配列番号：3 (図 4 および図 5 中 HK05490 で表されるのアミノ酸配列；図 7～図 15 中のアミノ酸配列) で表されるアミノ酸配列が相同性を示した。

次に疎水性プロットを解析したところ、図 6 のようになり、7 回膜貫通型 (G 蛋白質共役型) のレセプターをコードしていることが判明した。また、配列番号：

3で表されるアミノ酸配列で表される蛋白質は実施例1に記載の配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表される蛋白質と高い相同性を示すことが確認された（図4）。

さらに、本発明の配列番号：4で表されるDNAを保持するプラスミドpHK05490をE. coli JM109に導入して E. coli JM109/pHK05490を得た。

【0092】

【発明の効果】

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、①リガンド（アゴニスト）の決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

【0093】

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ：872

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Ala Glu Gln Thr Arg Asn His Leu Asn Ala Gly Asp Ile Thr Tyr Ser

1 5 10 15

Val Arg Ala Met Asp Gln Leu Val Gly Leu Leu Asp Val Gln Leu Arg

20 25 30

Asn Leu Thr Pro Gly Gly Lys Asp Ser Ala Ala Arg Ser Leu Asn Lys

35	40	45
Ala Met Val Glu Thr Val Asn Asn Leu Leu Gln Pro Gln Ala Leu Asn		
50	55	60
Ala Trp Arg Asp Leu Thr Thr Ser Asp Gln Leu Arg Ala Ala Thr Met		
65	70	75
Leu Leu His Thr Val Glu Glu Ser Ala Phe Val Leu Ala Asp Asn Leu		
85	90	95
Leu Lys Thr Asp Ile Val Arg Glu Asn Thr Asp Asn Ile Lys Leu Glu		
100	105	110
Val Ala Arg Leu Ser Thr Glu Gly Asn Leu Glu Asp Leu Lys Phe Pro		
115	120	125
Glu Asn Met Gly His Gly Ser Thr Ile Gln Leu Ser Ala Asn Thr Leu		
130	135	140
Lys Gln Asn Gly Arg Asn Gly Glu Ile Arg Val Ala Phe Val Leu Tyr		
145	150	155
Asn Asn Leu Gly Pro Tyr Leu Ser Thr Glu Asn Ala Ser Met Lys Leu		
165	170	175
Gly Thr Glu Ala Leu Ser Thr Asn His Ser Val Ile Val Asn Ser Pro		
180	185	190
Val Ile Thr Ala Ala Ile Asn Lys Glu Phe Ser Asn Lys Val Tyr Leu		
195	200	205
Ala Asp Pro Val Val Phe Thr Val Lys His Ile Lys Gln Ser Glu Glu		
210	215	220
Asn Phe Asn Pro Asn Cys Ser Phe Trp Ser Tyr Ser Lys Arg Thr Met		
225	230	235
Thr Gly Tyr Trp Ser Thr Gln Gly Cys Arg Leu Leu Thr Thr Asn Lys		
245	250	255
Thr His Thr Thr Cys Ser Cys Asn His Leu Thr Asn Phe Ala Val Leu		
260	265	270

Met	Ala	His	Val	Glu	Val	Lys	His	Ser	Asp	Ala	Val	His	Asp	Leu	Leu
	275						280						285		
Leu	Asp	Val	Ile	Thr	Trp	Val	Gly	Ile	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Cys	Leu
	290					295						300			
Leu	Ile	Cys	Ile	Phe	Thr	Phe	Cys	Phe	Phe	Arg	Gly	Leu	Gln	Ser	Asp
305					310					315				320	
Arg	Asn	Thr	Ile	His	Lys	Asn	Leu	Cys	Ile	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Glu
			325						330					335	
Leu	Leu	Phe	Leu	Ile	Gly	Ile	Asn	Arg	Thr	Asp	Gln	Pro	Ile	Ala	Cys
		340						345						350	
Ala	Val	Phe	Ala	Ala	Leu	Leu	His	Phe	Phe	Phe	Leu	Ala	Ala	Phe	Thr
		355						360						365	
Trp	Met	Phe	Leu	Glu	Gly	Val	Gln	Leu	Tyr	Ile	Met	Leu	Val	Glu	Val
	370						375					380			
Phe	Glu	Ser	Glu	His	Ser	Arg	Arg	Lys	Tyr	Phe	Tyr	Leu	Val	Gly	Tyr
385					390					395				400	
Gly	Met	Pro	Ala	Leu	Ile	Val	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Val	Asp	Tyr	Arg
			405						410					415	
Ser	Tyr	Gly	Thr	Asp	Lys	Val	Cys	Trp	Leu	Arg	Leu	Asp	Thr	Tyr	Phe
			420						425					430	
Ile	Trp	Ser	Phe	Ile	Gly	Pro	Ala	Thr	Leu	Ile	Ile	Met	Leu	Asn	Val
		435						440						445	
Ile	Phe	Leu	Gly	Ile	Ala	Leu	Tyr	Lys	Met	Phe	His	His	Thr	Ala	Ile
	450						455						460		
Leu	Lys	Pro	Glu	Ser	Gly	Cys	Leu	Asp	Asn	Ile	Lys	Ser	Trp	Val	Ile
465					470					475				480	
Gly	Ala	Ile	Ala	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Ala	Phe	Gly
					485					490				495	
Leu	Met	Tyr	Ile	Asn	Glu	Ser	Thr	Val	Ile	Met	Ala	Tyr	Leu	Phe	Thr

500	505	510
Ile Phe Asn Ser Leu Gln Gly Met Phe Ile Phe Ile Phe His Cys Val		
515	520	525
Leu Gln Lys Lys Val Arg Lys Glu Tyr Gly Lys Cys Leu Arg Thr His		
530	535	540
Cys Cys Ser Gly Lys Ser Thr Glu Ser Ser Ile Gly Ser Gly Lys Thr		
545	550	555
Ser Gly Ser Arg Thr Pro Gly Arg Tyr Ser Thr Gly Ser Gln Ser Arg		
565	570	575
Ile Arg Arg Met Trp Asn Asp Thr Val Arg Lys Gln Ser Glu Ser Ser		
580	585	590
Phe Ile Thr Gly Asp Ile Asn Ser Ser Ala Ser Leu Asn Arg Glu Gly		
595	600	605
Leu Leu Asn Asn Ala Arg Asp Thr Ser Val Met Asp Thr Leu Pro Leu		
610	615	620
Asn Gly Asn His Gly Asn Ser Tyr Ser Ile Ala Ser Gly Glu Tyr Leu		
625	630	635
Ser Asn Cys Val Gln Ile Ile Asp Arg Gly Tyr Asn His Asn Glu Thr		
645	650	655
Ala Leu Glu Lys Lys Ile Leu Lys Glu Leu Thr Ser Asn Tyr Ile Pro		
660	665	670
Ser Tyr Leu Asn Asn His Glu Arg Ser Ser Glu Gln Asn Arg Asn Leu		
675	680	685
Met Asn Lys Leu Val Asn Asn Leu Gly Ser Gly Arg Glu Asp Asp Ala		
690	695	700
Ile Val Leu Asp Asp Ala Thr Ser Phe Asn His Glu Glu Ser Leu Gly		
705	710	715
Leu Glu Leu Ile His Glu Glu Ser Asp Ala Pro Leu Leu Pro Pro Arg		
725	730	735

Val Tyr Ser Thr Glu Asn His Gln Pro His His Tyr Thr Arg Arg Arg			
740	745	750	
Ile Pro Gln Asp His Ser Glu Ser Phe Phe Pro Leu Leu Thr Asn Glu			
755	760	765	
His Thr Glu Asp Leu Gln Ser Pro His Arg Asp Ser Leu Tyr Thr Ser			
770	775	780	
Met Pro Thr Leu Ala Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Val Thr Thr Ser			
785	790	795	800
Thr Gln Thr Glu Pro Pro Pro Ala Lys Cys Gly Asp Ala Glu Asp Val			
805	810	815	
Tyr Tyr Lys Ser Met Pro Asn Leu Gly Ser Arg Asn His Val His Gln			
820	825	830	
Leu His Thr Tyr Tyr Gln Leu Gly Arg Gly Ser Ser Asp Gly Phe Ile			
835	840	845	
Val Pro Pro Asn Lys Asp Gly Thr Pro Pro Glu Gly Ser Ser Lys Gly			
850	855	860	
Pro Ala His Leu Val Thr Ser Leu			
865	870		

【0094】

【配列番号：2】

配列の長さ：2616

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GCTGAACAGA CAAGAAATCA CTTGAATGCT GGGGACATCA CCTACTCTGT CCGGGCCATG	60
GACCAGCTGG TAGGCCTCCT AGATGTACAG CTCGGAACCT TGACCCCAGG TGGAAAAGAT	120
AGTGCTGCCC GGAGTTTGAA CAAGGCAATG GTCGAGACAG TTAACAACCT CCTTCAGCCA	180

CAAGCTTTGA ATGCATGGAG AGACCTGACT ACGAGTGATC AGCTGCGTGC GGCCACCATG 240
 TTGCTTCATA CTGTGGAGGA AAGTGCTTTT GTGCTGGCTG ATAACCTTTT GAAGACTGAC 300
 ATTGTCAGGG AGAATACAGA CAATATTAAA TTGGAAGTTG CAAGACTGAG CACAGAAGGA 360
 AACTTAGAAG ACCTAAAAATT TCCAGAAAAAC ATGGGCCATG GAAGCACTAT CCAGCTGTCT 420
 GCAAATACCT TAAAGCAAAA TGGCCGAAAT GGAGAGATCA GAGTGGCCTT TGTCTGTAT 480
 AACAACTTGG GTCCTTATTT ATCCACGGAG AATGCCAGTA TGAAGTTGGG AACGGAAGCT 540
 TTGTCCACAA ATCATTCTGT TATTGTCAAT TCCCCTGTTA TTACGGCAGC AATAAACAAA 600
 GAGTTCAGTA ACAAGGTTTA TTTGGCTGAT CCTGTGGTAT TTA CTGTAA ACATATCAAG 660
 CAGTCAGAGG AAAATTTCAA CCCTAACTGT TCATTTTGA GCTACTCAA GCGTACAATG 720
 ACAGGTTATT GGTCAACACA AGGCTGTCGG CTCCTGACAA CAAATAAGAC ACATACTACA 780
 TGCTCTTGTA ACCACCTAAC AAATTTTGCA GTACTGATGG CACATGTGGA AGTTAAGCAC 840
 AGTGATGCGG TCCATGACCT CCTTCTGGAT GTGATCACGT GGGTTGGAAT TTTGCTGTCC 900
 CTTGTTTGTC TCCTGATTG CATCTTACA TTTTGCTTTT TCCGCGGGCT CCAGAGTGAC 960
 CGTAACACCA TCCACAAGAA CCTCTGCATC AGTCTCTTTG TAGCAGAGCT GCTCTTCCTG 1020
 ATTGGGATCA ACCGAACTGA CCAACCAATT GCCTGTGCTG TTTTCGCTGC CCTGTTTTCT 1080
 TCTTCTTGGC TGCCTTACC TGGATGTTCC TGGAGGGGGT GCAGCTTTAT ATACATCATG 1140
 CTGGTGGAGG TTTTGTAGAG TGAACATTCA CGTAGGAAAT ACTTTTATCT GGTCTGCTAT 1200
 GGGATGCCTG CACTCATTGT GGCTGTGTCA GCTGCAGTAG ACTACAGGAG TTATGGAACA 1260
 GATAAAGTAT GTTGGCTCCG ACTTGACACC TACTTCATTT GGAGTTTAT AGGACCAGCA 1320
 ACTTTGATAA TTATGCTTAA TGTAATCTTC CTGTTGATTG CTTTATATAA AATGTTTCAT 1380
 CATACTGCTA TACTGAAACC TGAATCAGGC TGTCTTGATA ACATCAAGTC ATGGGTTATA 1440
 GGTGCAATAG CTCTTCTCTG CCTATTAGGA TTGACCTGGG CCTTTGGACT CATGTATATT 1500
 AATGAAAGCA CAGTCATCAT GGCCTATCTC TTCACCATTT TCAATTCTCT ACAGGGAATG 1560
 TTTATATTTA TTTTCCATTG TGTCTACAG AAGAAGGTAC GAAAAGAGTA TGGGAAATGC 1620
 CTGCGAACAC ATTGCTGTAG TGGCAAAAGT ACAGAGAGTT CCATTGGTTC AGGGAAAACA 1680
 TCTGGTTCTC GAACTCCTGG ACGCTACTCC ACAGGCTCAC AGAGCCGAAT CCGTAGAATG 1740
 TGGAATGACA CGGTTCGAAA GCAGTCAGAG TCTTCCTTTA TTA CTGGAGA CATAAACAGT 1800
 TCAGCGTCAC TCAACAGAGA GGGGCTTCTG AACAAATGCCA GGGATACAAG TGTCATGGAT 1860
 ACTCTACCAC TGAATGGTAA CCATGGCAAT AGTTACAGCA TTGCCAGCGG CGAATACCTG 1920

AGCAACTGTG TGCAAATCAT AGACCGTGGC TATAACCATA ACGAGACCGC CCTAGAGAAA 1980
 AAGATTCTGA AGGAACTCAC TTCCAACAT ATCCCTTCTT ACCTGAACAA CCATGAGCGC 2040
 TCCAGTGAAC AGAACAGGAA TCTGATGAAC AAGCTGGTGA ATAACCTTGG CAGTGGAAGG 2100
 GAAGATGATG CCATTGTCCT GGATGATGCC ACCTCGTTTA ACCACGAGGA GAGTTTGGGC 2160
 CTGGAACCTCA TTCATGAGGA ATCTGATGCT CCTTTGCTGC CCCCAGAGT ATACTCCACC 2220
 GAGAACCACC AGCCACACCA TTATACCAGA AGGCGGATCC CCCAAGACCA CAGTGAGAGC 2280
 TTTTTCCTT TGCTAACCAA CGAGCACACA GAAGATCTCC AGTCACCCCA TAGAGACTCT 2340
 CTCTATACCA GCATGCCGAC ACTGGCTGGT GTGGCCGCCA CAGAGAGTGT TACCACCAGC 2400
 ACCCAGACCG AACCCCCACC GGCCAAATGT GGTGATGCCG AAGATGTTTA CTACAAAAGC 2460
 ATGCCAAACC TAGGCTCCAG AAACCACGTC CATCAGCTGC ATACTTACTA CCAGCTAGGT 2520
 CGCGGCAGCA GTGATGGATT TATAGTTCCT CCAAACAAAG ATGGGACCCC TCCCGAGGGA 2580
 AGTTCAAAAG GACCGGCTCA TTTGGTCACT AGTCTA 2616

【0095】

【配列番号：3】

配列の長さ：1021

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Glu Gly Ser Lys Gly Thr Lys Pro Pro Pro Ala Val Ser Thr Thr Lys

1 5 10 15

Ile Pro Pro Ile Thr Asn Ile Phe Pro Leu Pro Glu Arg Phe Cys Glu

20 25 30

Ala Leu Asp Ser Lys Gly Ile Lys Trp Pro Gln Thr Gln Arg Gly Met

35 40 45

Met Val Glu Arg Pro Cys Pro Lys Gly Thr Arg Gly Thr Ala Ser Tyr

50 55 60

Leu Cys Met Ile Ser Thr Gly Thr Trp Asn Pro Lys Gly Pro Asp Leu

65 70 75 80

Ser Asn Cys Thr Ser His Trp Val Asn Gln Leu Ala Gln Lys Ile Arg			
	85	90	95
Ser Gly Glu Asn Ala Ala Ser Leu Ala Asn Glu Leu Ala Lys His Thr			
	100	105	110
Lys Gly Pro Val Phe Ala Gly Asp Val Ser Ser Ser Val Arg Leu Met			
	115	120	125
Glu Gln Leu Val Asp Ile Leu Asp Ala Gln Leu Gln Glu Leu Lys Pro			
	130	135	140
Ser Glu Lys Asp Ser Ala Gly Arg Ser Tyr Asn Lys Leu Gln Lys Arg			
	145	150	155
Glu Lys Thr Cys Arg Ala Tyr Leu Lys Ala Ile Val Asp Thr Val Asp			
	165	170	175
Asn Leu Leu Arg Pro Glu Ala Leu Glu Ser Trp Lys His Met Asn Ser			
	180	185	190
Ser Glu Gln Ala His Thr Ala Thr Met Leu Leu Asp Thr Leu Glu Glu			
	195	200	205
Gly Ala Phe Val Leu Ala Asp Asn Leu Leu Glu Pro Thr Arg Val Ser			
	210	215	220
Met Pro Thr Glu Asn Ile Val Leu Glu Val Ala Val Leu Ser Thr Glu			
	225	230	235
Gly Gln Ile Gln Asp Phe Lys Phe Pro Leu Gly Ile Lys Gly Ala Gly			
	245	250	255
Ser Ser Ile Gln Leu Ser Ala Asn Thr Val Lys Gln Asn Ser Arg Asn			
	260	265	270
Gly Leu Ala Lys Leu Val Phe Ile Ile Tyr Arg Ser Leu Gly Gln Phe			
	275	280	285
Leu Ser Thr Glu Asn Ala Thr Ile Lys Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly			
	290	295	300
Arg Asn Ser Thr Ile Ala Val Asn Ser His Val Ile Ser Val Ser Ile			

305	310	315	320
Asn Lys Glu Ser Ser Arg Val Tyr Leu Thr Asp Pro Val Leu Phe Thr			
325	330	335	
Leu Pro His Ile Asp Pro Asp Asn Tyr Phe Asn Ala Asn Cys Ser Phe			
340	345	350	
Trp Asn Tyr Ser Glu Arg Thr Met Met Gly Tyr Trp Ser Thr Gln Gly			
355	360	365	
Cys Lys Leu Val Asp Thr Asn Lys Thr Arg Thr Thr Cys Ala Cys Ser			
370	375	380	
His Leu Thr Asn Phe Ala Ile Leu Met Ala His Arg Glu Ile Ala Tyr			
385	390	395	400
Lys Asp Gly Val His Glu Leu Leu Leu Thr Val Ile Thr Trp Val Gly			
405	410	415	
Ile Val Ile Ser Leu Val Cys Leu Ala Ile Cys Ile Phe Thr Phe Cys			
420	425	430	
Phe Phe Arg Gly Leu Gln Ser Asp Arg Asn Thr Ile His Lys Asn Leu			
435	440	445	
Cys Ile Asn Leu Phe Ile Ala Glu Phe Ile Phe Leu Ile Gly Ile Asp			
450	455	460	
Lys Thr Lys Tyr Ala Ile Ala Cys Pro Ile Phe Ala Gly Leu Leu His			
465	470	475	480
Phe Phe Phe Leu Ala Ala Phe Ala Trp Met Cys Leu Glu Gly Val Gln			
485	490	495	
Leu Tyr Leu Met Leu Val Glu Val Phe Glu Ser Glu Tyr Ser Arg Lys			
500	505	510	
Lys Tyr Tyr Tyr Val Ala Gly Tyr Leu Phe Pro Ala Thr Val Val Gly			
515	520	525	
Val Ser Ala Ala Ile Asp Tyr Lys Ser Tyr Gly Thr Glu Lys Ala Cys			
530	535	540	

Trp Leu His Val Asp Asn Tyr Phe Ile Trp Ser Phe Ile Gly Pro Val
 545 550 555 560
 Thr Phe Ile Ile Leu Leu Asn Ile Ile Phe Leu Val Ile Thr Leu Cys
 565 570 575
 Lys Met Val Lys His Ser Asn Thr Leu Lys Pro Asp Ser Ser Arg Leu
 580 585 590
 Glu Asn Ile Lys Ser Trp Val Leu Gly Ala Phe Ala Leu Leu Cys Leu
 595 600 605
 Leu Gly Leu Thr Trp Ser Phe Gly Leu Leu Phe Ile Asn Glu Glu Thr
 610 615 620
 Ile Val Met Ala Tyr Leu Phe Thr Ile Phe Asn Ala Phe Gln Gly Val
 625 630 635 640
 Phe Ile Phe Ile Phe His Cys Ala Leu Gln Lys Lys Val Arg Lys Glu
 645 650 655
 Tyr Gly Lys Cys Phe Arg His Ser Tyr Cys Cys Gly Gly Leu Pro Thr
 660 665 670
 Glu Ser Pro His Ser Ser Val Lys Ala Ser Thr Thr Arg Thr Ser Ala
 675 680 685
 Arg Tyr Ser Ser Gly Thr Gln Ser Arg Ile Arg Arg Met Trp Asn Asp
 690 695 700
 Thr Val Arg Lys Gln Ser Glu Ser Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ile Asn
 705 710 715 720
 Ser Thr Ser Thr Leu Asn Gln Gly Met Thr Gly Asn Tyr Leu Leu Thr
 725 730 735
 Asn Pro Leu Leu Arg Pro His Gly Thr Asn Asn Pro Tyr Asn Thr Leu
 740 745 750
 Leu Ala Glu Thr Val Val Cys Asn Ala Pro Ser Ala Pro Val Phe Asn
 755 760 765
 Ser Pro Gly His Ser Leu Asn Asn Ala Arg Asp Thr Ser Ala Met Asp

770	775	780	
Thr Leu Pro Leu Asn Gly Asn Phe Asn Asn Ser Tyr Ser Leu His Lys			
785	790	795	800
Gly Asp Tyr Asn Asp Ser Val Gln Val Val Asp Cys Gly Leu Ser Leu			
	805	810	815
Asn Asp Thr Ala Phe Glu Lys Met Ile Ile Ser Glu Leu Val His Asn			
	820	825	830
Asn Leu Arg Gly Ser Ser Lys Thr His Asn Leu Glu Leu Thr Leu Pro			
	835	840	845
Val Lys Pro Val Ile Gly Gly Ser Ser Ser Glu Asp Asp Ala Ile Val			
	850	855	860
Ala Asp Ala Ser Ser Leu Met His Ser Asp Asn Pro Gly Leu Glu Leu			
865	870	875	880
His His Lys Glu Leu Glu Ala Pro Leu Ile Pro Gln Arg Thr His Ser			
	885	890	895
Leu Leu Tyr Gln Pro Gln Lys Lys Val Lys Ser Glu Gly Thr Asp Ser			
	900	905	910
Tyr Val Ser Gln Leu Thr Ala Glu Ala Glu Asp His Leu Gln Ser Pro			
	915	920	925
Asn Arg Asp Ser Leu Tyr Thr Ser Met Pro Asn Leu Arg Asp Ser Pro			
	930	935	940
Tyr Pro Glu Ser Ser Pro Asp Met Glu Glu Asp Leu Ser Pro Ser Arg			
945	950	955	960
Arg Ser Glu Asn Glu Asp Ile Tyr Tyr Lys Ser Met Pro Asn Leu Gly			
	965	970	975
Ala Gly His Gln Leu Gln Met Cys Tyr Gln Ile Ser Arg Gly Asn Ser			
	980	985	990
Asp Gly Tyr Ile Ile Pro Ile Asn Lys Glu Gly Cys Ile Pro Glu Gly			
	995	1000	1005

Asp Val Arg Glu Gly Gln Met Gln Leu Val Thr Ser Leu

1010

1015

1020

【0096】

【配列番号：4】

配列の長さ：

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

```

GAAGGAAGCA AAGGGACAAA ACCACCTCCA GCAGTTTCTA CAACCAAAAT TCCACCTATA 60
ACAAATATTT TTCCCCTGCC AGAGAGATTC TGTGAAGCAT TAGACTCCAA GGGGATAAAG 120
TGGCCTCAGA CACAAAGGGG AATGATGGTT GAACGACCAT GCCCTAAGGG AACAAGAGGA 180
ACTGCCTCAT ATCTCTGCAT GATTTCCACT GGAACATGGA ACCCTAAGGG CCCCATCTT 240
AGCAACTGTA CCTCACA CTG GGTGAATCAG CTGGCTCAGA AGATCAGAAG CGGAGAAAAT 300
GCTGCTAGTC TTGCAATGA ACTGGCTAAA CATACCAAAG GGCCAGTGTT TGCTGGGGAT 360
GTAAGTTCTT CAGTGAGATT GATGGAGCAG TTGGTGGACA TCCTTGATGC ACAGCTGCAG 420
GAACTGAAAC CTAGTGAAAA AGATTCAGCT GGACGGAGTT ATAACAAGCT CCAAAAACGA 480
GAGAAGACAT GCAGGGCTTA CCTTAAGGCA ATTGTTGACA CAGTGGACAA CCTTCTGAGA 540
CCTGAAGCTT TGAATCATG GAAACATATG AATTCTTCTG AACAAGCACA TACTGCAACA 600
ATGTTACTCG ATACATTGGA AGAAGGAGCT TTTGTCCTAG CTGACAATCT TTTAGAACCA 660
ACAAGGTCT CAATGCCAC AGAAAATATT GTCCTGGAAG TTGCCGTACT CAGTACAGAA 720
GGACAGATCC AAGACTTTAA ATTTCTCTG GGCATCAAAG GAGCAGGCAG CTCAATCCAA 780
CTGTCCGCAA ATACCGTCAA ACAGAACAGC AGGAATGGGC TTGCAAAGTT GGTGTTTCATC 840
ATTTACCGGA GCCTGGGACA GTTCCTTAGT ACAGAAAATG CAACCATTAA ACTGGGTGCT 900
GATTTTATTG GTCGTAATAG CACCATTGCA GTGAACTCTC ACGTCATTTT AGTTTCAATC 960
AATAAAGAGT CCAGCCGAGT ATACCTGACT GATCCTGTGC TTTTACCCT GCCACACATT 1020
GATCCTGACA ATTATTTCAA TGCAAACTGC TCCTTCTGGA ACTACTCAGA GAGAACTATG 1080
ATGGGATATT GGTCTACCCA GGGCTGCAAG CTGGTTGACA CTAATAAAAC TCGAACAACG 1140
    
```

TGTGCATGCA GCCACCTAAC CAATTTTGCA ATTCTCATGG CCCACAGGGA AATTGCATAT 1200
 AAAGATGGCG TTCATGAATT ACTTCTTACA GTCATCACCT GGGTGGGAAT TGTCATTTCC 1260
 CTTGTTTGCC TGGCTATCTG CATCTTCACC TTCTGCTTTT TCCGTGGCCT ACAGAGTGAC 1320
 CGAAATACTA TTCACAAGAA CCTTTGTATC AACCTTTTCA TTGCTGAATT TATTTTCCTA 1380
 ATAGGCATTG ATAAGACAAA ATATGCGATT GCATGCCCAA TATTTGCAGG ACTTCTACAC 1440
 TTTTCTTTT TGGCAGCTTT TGCTTGGATG TGCCTAGAAG GTGTGCAGCT CTACCTAATG 1500
 TTAGTTGAAG TTTTGGAAAG TGAATATTCA AGGAAAAAAT ATTACTATGT TGCTGGTTAC 1560
 TTGTTTCCTG CCACAGTGGT TGGAGTTTCA GCTGCTATTG ACTATAAGAG CTATGGAACA 1620
 GAAAAAGCTT GCTGGCTTCA TGTTGATAAC TACTTTATAT GGAGCTTCAT TGGACCTGTT 1680
 ACCTTCATTA TTCTGCTAAA TATTATCTTC TTGGTGATCA CATTGTGCAA AATGGTGAAG 1740
 CATTCAAACA CTTTGAAACC AGATTCTAGC AGGTTGAAA ACATTAAGTC TTGGGTGCTT 1800
 GCGCTTTTCG CTCTTCTGTG TCTTCTTGGC CTCACCTGGT CCTTTGGGTT GCTTTTTATT 1860
 AATGAGGAGA CTATTGTGAT GGCATATCTC TTCACTATAT TTAATGCTTT CCAGGGAGTG 1920
 TTCATTTTCA TCTTTCCTG TGCTCTCCAA AAGAAAGTAC GAAAAGAATA TGGCAAGTGC 1980
 TTCAGACACT CATACTGCTG TGGAGGCCTC CCAACTGAGA GTCCCCACAG TTCAGTGAAG 2040
 GCATCAACCA CCAGAACCAG TGCTCGCTAT TCCTCTGGCA CACAGAGTCG TATAAGAAGA 2100
 ATGTGGAATG AACTGTGAG AAAACAATCA GAATCTTCTT TTATCTCAGG TGACATCAAT 2160
 AGCACTTCAA CACTTAATCA AGGAATGACT GGCAATTACC TACTAACAAA CCCTCTTCTT 2220
 CGACCCACG GCACTAACAA CCCCTATAAC ACATTGCTCG CTGAAACAGT TGTATGTAAT 2280
 GCCCCTTCAG CTCCTGTATT TAACTACCA GGACATTCAC TGAACAATGC CAGGGATACA 2340
 AGTGCCATGG AACTCTACC GCTAAATGGT AATTTTAAACA ACAGCTACTC GCTGCACAAG 2400
 GGTGACTATA ATGACAGCGT GCAAGTTGTG GACTGTGGAC TAAGTCTGAA TGATACTGCT 2460
 TTTGAGAAAA TGATCATTTT AGAATTAGTG CACAACAAT TACGGGGCAG CAGCAAGACT 2520
 CACAACCTCG AGCTCAGCT ACCAGTCAA CCTGTGATTG GAGGTAGCAG CAGTGAAGAT 2580
 GATGCTATTG TGGCAGATGC TTCATCTTTA ATGCACAGCG ACAACCCAGG GCTGGAGCTC 2640
 CATCACAAAG AACTCGAGGC ACCACTTATT CCTCAGCGGA CTCACTCCCT TCTGTACCAA 2700
 CCCCAGAAGA AAGTGAAGTC CGAGGGAACT GACAGCTATG TCTCCCAACT GACAGCAGAG 2760
 GCTGAAGATC ACCTACAGTC CCCCACAGA GACTCTCTTT ATACAAGCAT GCCCAATCTT 2820
 AGAGACTCTC CCTATCCGGA GAGCAGCCCT GACATGGAAG AAGACCTCTC TCCCTCCAGG 2880

```

AGGAGTGAGA ATGAGGACAT TTAATAAAA AGCATGCCAA ATCTTGGAGC TGGCCATCAG 2940
CTTCAGATGT GCTACCAGAT CAGCAGGGGC AATAGTGATG GTTATATAAT CCCCATTAAC 3000
AAAGAAGGGT GTATTCCAGA AGGAGATGTT AGAGAAGGAC AAATGCAGCT GGTTACAAG 3060
CTT
3063

```

【0097】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られた本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図2に続く）。

【図2】実施例1で得られた本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図1の続き）。

【図3】図1および図2に示したアミノ酸配列をもとに作成した、本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロットを示す。1～7で示した部分は疎水性ドメインを示す。

【図4】実施例1で得られた本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HK05006で表される配列）および実施例2で得られた本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HK05490で表される配列）を示す（図5に続く）。

【図5】実施例1で得られた本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HK05006で表される配列）および実施例2で得られた本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HK05490で表される配列）を示す（図4の続き）。

【図6】実施例2で得られた本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列をもとに作成した、本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロットを示す。1～7で示した部分は疎水性ドメインを示す。

【図 7】実施例 2 で得られた本発明のヒト脳由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図 8 に続く）。

【図 8】実施例 2 で得られた本発明のヒト脳由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図 7 の続き、図 8 に続く）。

【図 9】実施例 2 で得られた本発明のヒト脳由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図 8 の続き、図 10 に続く）。

【図 10】実施例 2 で得られた本発明のヒト脳由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図 9 の続き、図 11 に続く）。

【図 11】実施例 2 で得られた本発明のヒト脳由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図 10 の続き、図 12 に続く）。

【図 12】実施例 2 で得られた本発明のヒト脳由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図 11 の続き、図 13 に続く）。

【図 13】実施例 2 で得られた本発明のヒト脳由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図 12 の続き、図 14 に続く）。

【図 14】実施例 2 で得られた本発明のヒト脳由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図 13 の続き、図 15 に続く）。

【図 15】実施例 2 で得られた本発明のヒト脳由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図 14 の続き）。

【書類名】 図面

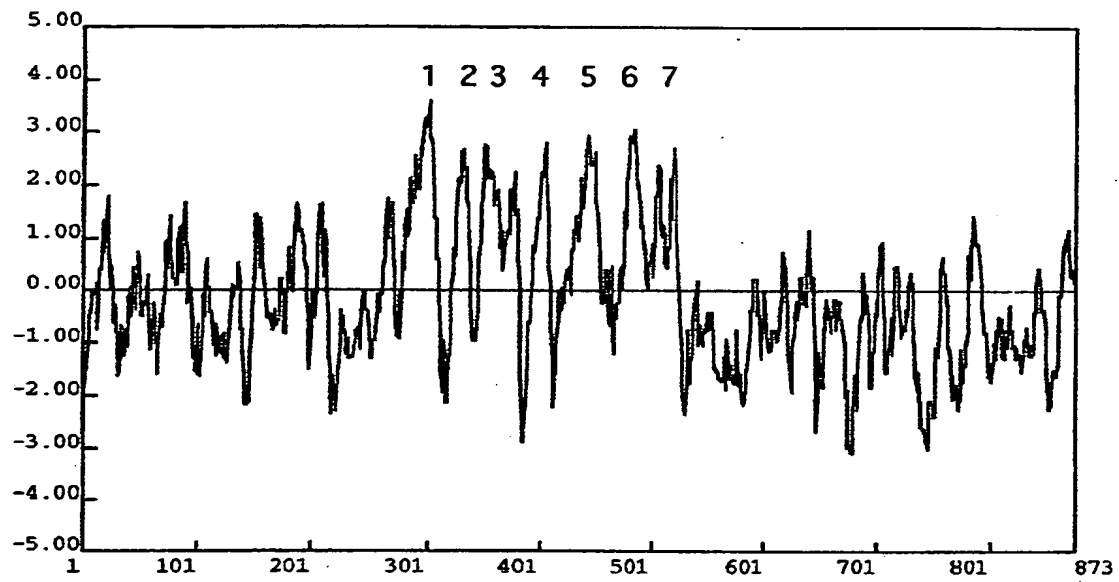
【図1】

1	GCTGAACAGACAAGAAATCACTTGAATGCTGGGACATCACCTACTCTGTCCGGGCCATG	60
1	AlaGluGlnThrArgAsnHisLeuAsnAlaGlyAspIleThrTyrSerValArgAlaMet	20
61	GACCAGCTGGTAGGCCCTCTAGATGTACAGCTTCGGAACITGACCCAGGTGGAAAAGAT	120
21	AspGlnLeuValGlyLeuLeuAspValGlnLeuArgAsnLeuThrProGlyGlyLysAsp	40
121	AGTGCTGCCCCGAGTTTGAACAAGGCAATGGTCGAGACAGTTAACAACCTCCTTCAGCCA	180
41	SerAlaAlaArgSerLeuAsnLysAlaMetValGluThrValAsnAsnLeuLeuGlnPro	60
181	CAAGCTTTGAATGCATGGAGAGACCTGACTACGAGTGATCAGCTGCCGTGGGCCACCATG	240
61	GlnAlaLeuAsnAlaTrpArgAspLeuThrThrSerAspGlnLeuArgAlaAlaThrMet	80
241	TTGCTTCATACTGTGGAGGAAAGTGCTTTTGTGCTGGCTGATAACCTTTTCAAGACTGAC	300
81	LeuLeuHisThrValGluGluSerAlaPheValLeuAlaAspAsnLeuLeuLysThrAsp	100
301	ATTGTCAGGGAGAATACAGACAATATTAAATTGGAAGTTGCAAGACTGAGCACAGAAGGA	360
101	IleValArgGluAsnThrAspAsnIleLysLeuGluValAlaArgLeuSerThrGluGly	120
361	AACCTAGAAGACCTAAATTTCCAGAAAACATGGCCATGGAAGCACTATCCAGCTGTCT	420
121	AsnLeuGluAspLeuLysPheProGluAsnMetGlyHisGlySerThrIleGlnLeuSer	140
421	GCAAAATACCTTAAAGCAAAATGGCCGAAATGGAGAGATCAGCTGGCCTTTGTCTGTAT	480
141	AlaAsnThrLeuLysGlnAsnGlyArgAsnGlyGluIleArgValAlaPheValLeuTyr	160
481	AACAACCTTGGTCCCTTATTATCCACGGAGAATGCCAGTATGAAGTTGGGAACGGAAGCT	540
161	AsnAsnLeuGlyProTyrLeuSerThrGluAsnAlaSerMetLysLeuGlyThrGluAla	180
541	TTGTCCACAAATCATCTCTGTATTGTCAATTCCOCTGTTATTACCGCAGCAATAACAAA	600
181	LeuSerThrAsnHisSerValIleValAsnSerProValIleThrAlaAlaIleAsnLys	200
601	GAGTTCAGTAACAAGGTTTATTTTGGCTGATCCTGTGGTATTACTGTAAACATATCAAG	660
201	GluPheSerAsnLysValTyrLeuAlaAspProValValPheThrValLysHisIleLys	220
661	CAGTCAGAGGAAAATTTCAACCTTAACCTGTTTCATTTTGGAGCTACTCCAAGCGTACATG	720
221	GlnSerGluGluAsnPheAsnProAsnCysSerPheTrpSerTyrSerLysArgThrMet	240
721	ACAGGTTATTTGCTCAACACAAGGCTGTGGCTCCTGACAACAAATAAGACACATACTACA	780
241	ThrGlyTyrTrpSerThrGlnGlyCysArgLeuLeuThrThrAsnLysThrHisThrThr	260
781	TGCTCTTGTAACCACTAACAAATTTGCACTACTGATGGCACATGTGAAAGTTAAGCAC	840
261	CysSerCysAsnHisLeuThrAsnPheAlaValLeuMetAlaHisValGluValLysHis	280
841	AGTGTATGGCTCCATGACCTCTTCTGGATGTGATCAGTGGGTTCGAAATTTTGCTGTCC	900
281	SerAspAlaValHisAspLeuLeuLeuAspValIleThrTrpValGlyIleLeuLeuSer	300
901	CTTGTTTGCTCTCTGATTGTCATCTTCACATTTTGCTTTTTCGGGGCTCCAGAGTGAC	960
301	LeuValCysLeuLeuIleCysIlePheThrPheCysPhePheArgGlyLeuGlnSerAsp	320
961	CGTAACACCATCCACAAGAACCTCTGCATCAGTCTCTTTGTAGCAGAGCTGCTCTTCTTG	1020
321	ArgAsnThrIleHisLysAsnLeuCysIleSerLeuPheValAlaGluLeuLeuPheLeu	340
1021	ATTGGGATCAACCGAAGTACCAACCAATTGCCCTGTGCTGTTTTCGCTGCCCTGTTACAT	1080
341	IleGlyIleAsnArgThrAspGlnProIleAlaCysAlaValPheAlaAlaLeuLeuHis	360
1081	TTCTTCTTCTTGCGTGCCTTCACCTGGATGTTCTTGGAGGGGGTGCAGCTTTATATCATG	1140
361	PhePhePheLeuAlaAlaPheThrTrpMetPheLeuGluGlyValGlnLeuTyrIleMet	380
1141	CTGGTGGAGGCTTTTGTAGAGTGAACATTCACGTAGGAATACTTTTATCTGGTGGCTAT	1200
381	LeuValGluValPheGluSerGluHisSerArgArgLysTyrPheTyrLeuValGlyTyr	400
1201	GGGATGCCCTGCACCTATTGTGGCTGTGTGCTCAGCTGCAGTACAGGAGTTATGGAACA	1260
401	GlyMetProAlaLeuIleValAlaValSerAlaAlaValAspTyrArgSerTyrGlyThr	420
1261	GATTAAGTATGTTGGCTCCGACTTGACACCTACTTCATTGAGTTTTATAGGACCAGCA	1320
421	AspLysValCysTrpLeuArgLeuAspThrTyrPheIleTrpSerPheIleGlyProAla	440
1321	ACTTTGATAAATTATGCTTAATGTAATCTTCTTGGGATTGCTTTATATAAAATGTTTCAT	1380
441	ThrLeuIleIleMetLeuAsnValIlePheLeuGlyIleAlaLeuTyrLysMetPheHis	460
1381	CATACTGCTATACTGAAACCTGAATCAGGCTGTCTTGATAACATCAAGTCATGGGTTATA	1440
461	HisThrAlaIleLeuLysProGluSerGlyCysLeuAspAsnIleLysSerTrpValIle	480
1441	GGTGCAATAGCTCTTCTCTGCTATTAGGATTGACCTGGGCTTTGGACTCATGTATATT	1500
481	GlyAlaIleAlaLeuLeuCysLeuLeuGlyLeuThrTrpAlaPheGlyLeuMetTyrIle	500

【图 2】

1501	AATGAAAGCACAGTCATCATGGCCTATCTCTTACCACTTTTCAATTCCTACAGGGAATG	1560
501	AsnGluSerThrValIleMetAlaTyrLeuPheThrIlePheAsnSerLeuGlnGlyMet	520
1561	TTTATATTTATTTTCCATTGTGCTCAGAGAAGGTACGAAAGAGTATCGGAAATGC	1620
521	PheIlePheIlePheHisCysValLeuGlnLysLysValArgLysGluTyrGlyLysCys	540
1621	CTGCGAACACATTGCTGTAGTGGCAAAAGTACAGAGAGTTCATTGGTTCAGGGAAACA	1680
541	LeuArgThrHisCysCysSerGlyLysSerThrGluSerSerIleGlySerGlyLysThr	560
1681	TCTGGTTCTCGAACTCTGGACGCTACTCCACAGGCTCAGAGCGGAATCCGTAGAATG	1740
561	SerGlySerArgThrProGlyArgTyrSerThrGlySerGlnSerArgIleArgArgMet	580
1741	TGGAATGACACGGTTCCGAAAGCAGTCACAGTCTTCTTTATTACTGGAGACATAACAGT	1800
581	TyrAsnAspThrValArgLysGlnSerGluSerSerPheIleThrGlyAspIleAsnSer	600
1801	TCAGCGTCACTCAACAGAGAGGGCTTCTGAACAATGCCAGGGATACAAGTGTATGGAT	1860
601	SerAlaSerLeuAsnArgGluGlyLeuLeuAsnAsnAlaArgAspThrSerValMetAsp	620
1861	ACTCTACCACTGAATGCTAACCATGGCAATAGTTACAGCATTGCCAGCGGGAATACCTG	1920
621	ThrLeuProLeuAsnGlyAsnHisGlyAsnSerTyrSerIleAlaSerGlyGluTyrLeu	640
1921	AGCAACTGTGTGCAATCATACACCGTGGCTATAACCATAACGAGACCGCCCTAGAGAA	1980
641	SerAsnCysValGlnIleIleAspArgGlyTyrAsnHisAsnGluThrAlaLeuGluLys	660
1981	AAGATCTCGAAGGAATCACTTCCAACTATATCCCTTCTTACCTGAACAACCATGAGCGC	2040
661	LysIleLeuLysGluLeuThrSerAsnTyrIleProSerTyrLeuAsnAsnHisGluArg	680
2041	TCCAGTGAACAGAACAGGAATCTGATGAACAGCTGGTGAATAACCTTGGCAGTGAAGG	2100
681	SerSerGluGlnAsnArgAsnLeuMetAsnLysLeuValAsnAsnLeuGlySerGlyArg	700
2101	GAAGATGATGCCATTGCTCGGATGATGCCACCTCGTTTAACTACGAGGAGATTGGGC	2160
701	GluAspAspAlaIleValLeuAspAspAlaThrSerPheAsnHisGluGluSerLeuGly	720
2161	CTGGAATCATTTATGAGGAATCTGATGCTCCTTTGCTGCCGCCAAGAGTATACTCCACC	2220
721	LeuGluLeuIleHisGluGluSerAspAlaProLeuLeuProProArgValTyrSerThr	740
2221	GAGAACCACACGCCACACCATTTATACCAGAAGCGGATCCGCCAAGACCACAGTGAGAGC	2280
741	GluAsnHisGlnProHisTyrThrArgArgArgIleProGlnAspHisSerGluSer	760
2281	TTTTTCCCTTTTGCTAACCAACGAGCACACAGAAGATCTCCAGTCACCCCATAGAGACTCT	2340
761	PhePheProLeuLeuThrAsnGluHisThrGluAspLeuGlnSerProHisArgAspSer	780
2341	CTCTATACCAGCATGCCGACACTGGCTGGTGTGGCCGCLACAGAGAGTGTACCACCAGC	2400
781	LeuTyrThrSerMetProThrLeuAlaGlyValAlaAlaThrGluSerValThrThrSer	800
2401	ACCAGACCGAACCCCCACCGGCCAAATGTGGTGTATGCCGAAGATGTTTACTACAAAAGC	2460
801	ThrGlnThrGluProProProAlaLysCysGlyAspAlaGluAspValTyrTyrLysSer	820
2461	ATGCCAAACCTTAGGCTCCAGAAACCACTTCCATCAGCTGCATACTTACTACCAGCTAGGT	2520
821	MetProAsnLeuGlySerArgAsnHisValHisGlnLeuHisThrTyrTyrGlnLeuGly	840
2521	CGGGCAGCAGTGATGGATTATAGTTTCTTCAAACAAGATGGGACCCCTCCCGAGGGA	2580
841	ArgGlySerSerAspGlyPheIleValProProAsnLysAspGlyThrProProGluGly	860
2581	AGTTCAAAGGACCGGCTCATTTGGTCACTAGTCTATAGAAGATGACACAGAAATTGGAA	2640
861	SerSerLysGlyProAlaHisLeuValThrSerLeu***	873
2641	CCAACAAAACCTGCTAACACCTTGTGACTGTCTTGAGTTGATATAAGCAGTGGTAATAAT	2700
873		873
2701	GTGTGTACTCTTAAATCTTTATGCTGTCTCTAAAGACAAACACAACTCTCAGACTTTT	2760
873		873
2761	TTTTTTTTTAATGGGATTTTATAGTTCAGCCAGGGAGAAAGATAACTGCTAAAATTCCC	2820
873		873
2821	CTGTACCCCATCTTTCTTTGCTCTTCCCTTCAGATGGAGACTTCATTATGTAATGAA	2880
873		873
2881	CAAGATATGAAGAAAAATGGCACTCATTTGTGGCCTTGTGAATTATGTTGTGTATGTTTA	2940
873		873
2941	ACATCTCTGATGCTGTGTACTTAAATTTACAAGTACCTGCTTTTTTAAAGGCCAGAACAA	3000
873		873

【図 3】



【図4】

1	EGSKG	TKPPA	VS	TTKIP	ITNIF	PLPER	FC	AL	DS	KG	IK	WP	OT	RG	MM	V	HK05006
1																	HK05490
1	ERPCP	KG	TR	GT	AS	YL	CM	IS	TG	TW	NP	KG	PD	LS	NC	TS	HK05006
51																	HK05490
1																	
101	AAS	LAN	EL	AK	HT	KG	PP	VF	AG	DY	SS	VR	LM	EO	LV	DI	HK05006
																	HK05490
43	ARS	LNK															HK05006
151	GRS	YNK	L	OK	RE	KT	CR	AY	L	KA	I	VD	T	V	D	N	HK05490
80	MLI	H	T	VE	ES	AF	V	L	AD	N	L	K	T	D	I	V	HK05006
201	MLL	D	T	LE	EG	AF	V	L	AD	N	L	LE	P	T	R	V	HK05490
130	NM	-	G	H	G	S	T	I	Q	L	S	AN	T	L	K	Q	HK05006
251																	HK05490
179	EAL	S	T	N	H	S	V	I	V	N	S	P	V	I	T	A	HK05006
301	D	F	I	G	R	N	S	T	I	A	V	N	S	H	V	I	HK05490
229	NC	S	F	W	S	Y	S	K	R	T	M	T	G	Y	N	S	HK05006
349	NC	S	F	W	N	Y	S	E	R	T	M	G	Y	N	S	T	HK05490
279	K	H	S	D	A	V	H	D	L	L	D	V	I	T	W	V	HK05006
399	A	Y	K	D	G	V	H	E	L	L	L	T	V	I	T	W	HK05490
329	C	I	S	L	F	V	A	E	L	L	F	I	G	I	N	R	HK05006
449	C	I	N	L	E	I	A	E	F	I	F	L	I	G	I	D	HK05490
379	I	M	L	V	E	V	F	E	S	E	H	S	R	R	K	Y	HK05006
499	L	M	L	V	E	V	F	E	S	E	Y	S	R	K	K	Y	HK05490

429 DT Y F I W S F I G P A T L I I M L N V I F L G I A L Y K M F H T A I L K P E S G C L D N I K S W HK05006
549 D N Y F I W S F I G P V T F I I L L N I I F L V I T L C K M V K H S N T L K P D S S R L E N I K S W HK05490

479 V I G A I A L L C L L G L T W A F G I M Y I N E S T V I M A Y L F T I F N S L Q G M F I F I F H C V HK05006
599 V L G A F A L L C L L G L T W S F G L L F I N E T I V M A Y L F T I F N A F Q G V F I F I F H C A HK05490

529 L Q K K V R K E Y G K C L R - T H C C S G K S T E S S I G S G K T S G S R T P G R Y S T G S Q S R I HK05006
649 L Q K K V R K E Y G K C F R H S Y C C G G L P T E S P H S S V K A S T T R T S A R Y S S G T O S R I HK05490

578 R R M W N D T V R K Q S E S S F I T G D I N S S A S L N R E G L - - - - - HK05006
699 R R M W N D T V R K Q S E S S F I S G D I N S T S T L N - Q G M T G N Y L L T N P L L R P H G T N N HK05490

610 - - - - -
748 P Y N T L L A E T V Y C N A P S A P V F N S P G H S L N N A R D T S A M D T L P L N G N F N N S Y S HK05006
HK05490

634 I A S G E Y L S N C V Q I I D R G Y N H N E T A L E K K I L K E L T S N Y I P S Y L N N H E R S S E HK05006
798 L H K G D Y - N D S V Q V Y D C G L S L N D T A F E K M I I S E I - - - - - V H N N L R G S S HK05490

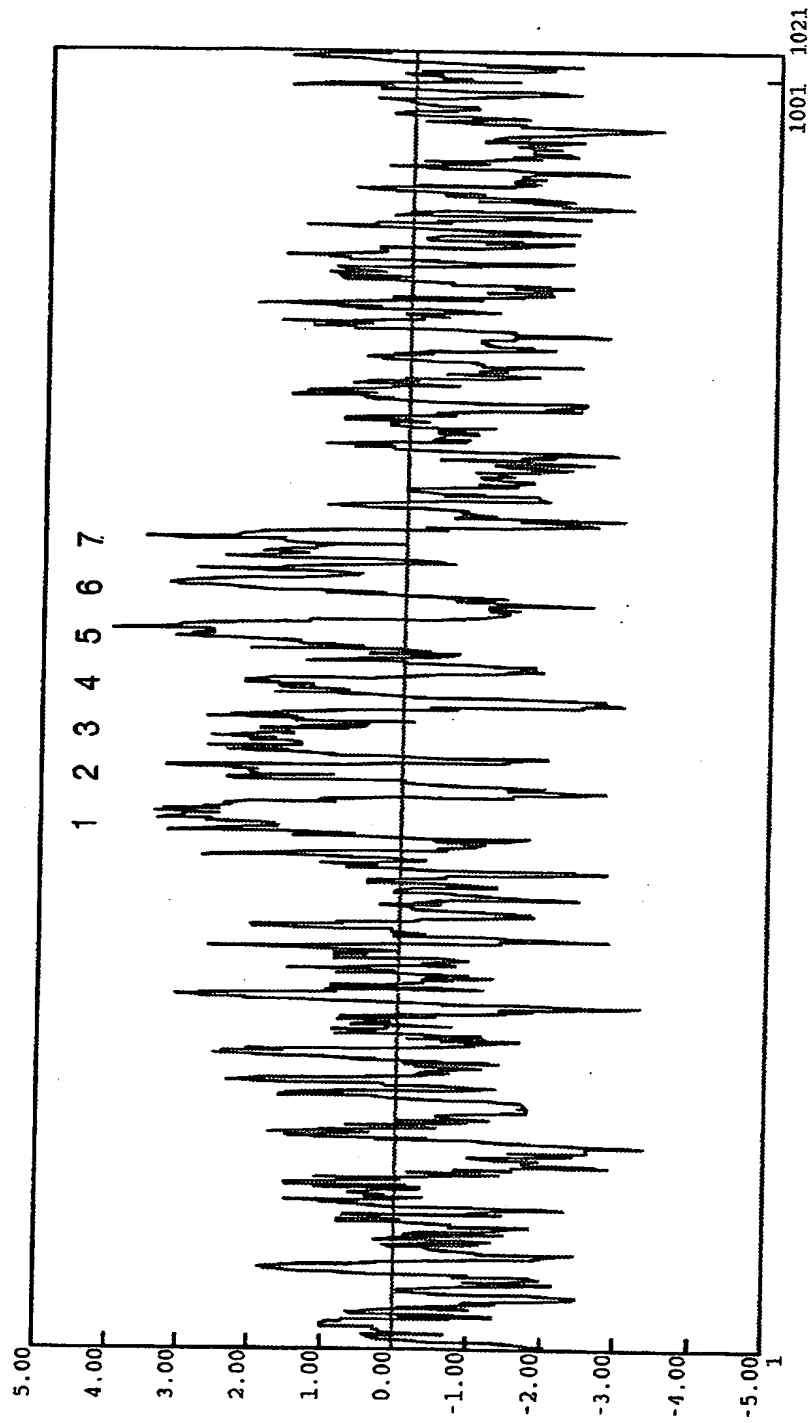
684 Q N R N L M N K L V N N - - L G S G R E D D A I V L D D A T S F N H E S L G L E L I H E E S D A P HK05006
839 K T H N L E L T I P V K P V I G G S S E D D A I V A D A S S L M H S D N P G L E L H H K E L E A P HK05490

732 L L P P R V Y S T E N H Q P H H Y T R R R I P O D H S E S F F P L L T N E H T E D L Q S P H R D S L HK05006
889 L I P O R T H S L I - Y Q P O - - - K K Y K S E G T D S Y V S Q L T A E A E D H L O S P N R D S L HK05490

782 Y T S M P T L A G V A A T E S V T T S T Q T E P P P A K C G D A E D V Y Y K S M P N L G S R N H V H HK05006
934 Y T S M P N L R D S P Y P E S - S P D M E E D L S P S R R S E N E D I Y Y K S M P N L G A - - - G H HK05490

832 Q L H T Y Y Q L G R G S S D G E I V P P N K D G T P P E G S S K - G P A H L V T S L HK05006
980 Q L C M C Y Q I S R G N S D G Y I P I N K E G C I P E G D V R E G Q M O L V T S L HK05490

【図 6】



【図 7】

1	GAAGGAAGCAAGGGACAAACCACTCCAGCAGTTTCTACAAACCAAAATCCACCTATA	60
1	GlUGlySerLysGlyThrLysProProProAlaValSerThrThrLysIleProProIle	20
61	ACAAATATTTTCCCTGCCAGAGAGATTCTGTGAGCATAGACTCCAAGGGGATAAAG	120
21	ThrAsnIlePheProLeuProGluuArgPheCysGluAlaLeuAspSerLysGlyIleLys	40
121	TGGCCTCAGACACAAAGGGGAATGATGGTTGACGACCATGCCCTAAGGGAACAAGGA	180
41	TrpProGlnThrGlnArgGlyMetMetValGluuArgProCysProLysGlyThrArgGly	60
181	ACTGCCTCATATCTCTGCATGATTTCACCTGGAACATGGAACCTAAGGCCCGCATCTT	240
61	ThrAlaSerTyrLeuCysMetIleSerThrGlyThrTrpAsnProLysGlyProAspLeu	80
241	AGCAACTGTACCTCAGCTGGTGATCAGCTGGCTCAGAGATCAGAGCGGAGAAAT	300
81	SerAsnCysThrSerHisTrpValAsnGlnLeuAlaGlnLysIleArgSerGlyGluAsn	100
301	GCTGCTAGTCTTGCCAATGAACTGGCTAAACATACCAAGGGCCAGTGTCTGGGGAT	360
101	AlaAlaSerLeuAlaAsnGluLeuAlaLysHisThrLysGlyProValPheAlaGlyAsp	120
361	GTAAGTTCTTCAGTGAGATTGATGGAGCAGTTGGTGACATCCTTGATGCACAGCTGCAG	420
121	ValSerSerSerValArgLeuMetGluGlnLeuValAspIleLeuAspAlaGlnLeuGln	140
421	GAAGTGAACCTAGTGAAAGATTTCAGCTGGACGGAGTTTATACAAAGCTCCAAAACGA	480
141	GluLeuLysProSerGluLysAspSerAlaGlyArgSerTyrAsnLysLeuGlnLysArg	160

【図 8】

481 GAGAAGACATGCAGGGCTTACCTTAAGSCAATTGTGACACAGTGGACAACCTTCTGAGA 540
161 GluLysThrCysArgAlaTyrLeuLysAlaIleValAspThrValAspAsnLeuLeuArg 180

541 CCTGAAGCTTTGGAATCATGGAACATATGAAATCTTCTGAAACAAGCACATACATGCAACA 600
181 ProGluAlaLeuGluSerTyrLysHisMetAsnSerSerGluGlnAlaHisThrAlaThr 200

601 ATGTTACTCGATACATGGAAGAGAGCTTTTGTCTAGCTGACAAATCTTTTAGAACCA 660
201 MetLeuLeuAspThrLeuGluGluGlyAlaPheValLeuAlaAspAsnLeuLeuGluPro 220

661 ACAAGGCTCTCAATGCCACAGAAATATTGTCTGGAAGTTGCCGTACTCAGTACAGAA 720
221 ThrArgValSerMetProThrGluAsnIleValLeuGluValAlaValLeuSerThrGlu 240

721 GGACAGATCCAAGACTTTAAATTTCTCTCTGGGCATCAAGAGCAGCAGCCTCAATCCAA 780
241 GlyGlnIleGlnAspPheLysPheProLeuGlyIleLysGlyAlaGlySerSerIleGln 260

781 CTGTCCGCAATACCGTCAACAGAACAGCAGGAATGGGCTTGCAAGTTGGTGTTCATC 840
261 LeuSerAlaAsnThrValLysGlnAsnSerArgAsnGlyLeuAlaLysLeuValPheIle 280

841 ATTACCGGAGCCTGGACAGTTCTTGTACAGAAATGCCAACCATTAACCTGGTGCT 900
281 IleTyrArgSerLeuGlyGlnPheLeuSerThrGluAsnAlaThrIleLysLeuGlyAla 300

901 GATTTTATTGTGTAATAGCACCAATTCAGTGAACCTCTCAGTCAATTCAGTTTCAATC 960
301 AspPheIleGlyArgAsnSerThrIleAlaValAsnSerHisValIleSerValSerIle 320

961 AATAAGAGTCCAGCCGAGTATACCTGACTGATCTGTGCTTTTAACTGCCACACATT 1020

【図 9】

321	AsnLysGluSerSerArgValTyrLeuThrAspProValLeuPheThrLeuProHisIle	340
1021	GATCCTGACAATTATTTCAATGCAAACTGCTCCTTCTGGAAGTACTACTCAGAGAACTATG	1080
341	AspProAspAsnTyrPheAsnAlaAsnCysSerPheTyrAsnTyrSerGluArgThrMet	360
1081	ATGGGATATTGCTCTACCCAGGCTGCAAGCTGTTGACACTAATAAACTCGAACAAAG	1140
361	MetGlyTyrTrpSerThrGlnGlyCysLysLeuValAspThrAsnLysThrArgThrThr	380
1141	TGTGCATGCAGCCACCTAACCAATTTTGCAATTTCTCATGGCCACAGGAAATTCATAT	1200
381	CysAlaCysSerHisLeuThrAsnPheAlaIleLeuMetAlaHisArgGluIleAlaTyr	400
1201	AAAGATGGGCTTCATGAATTACTTCTTACAGTCATCACCTGGGTGGGAATTCATTTCC	1260
401	LysAspGlyValHisGluLeuLeuLeuThrValIleThrTrpValGlyIleValIleSer	420
1261	CTTGTTGGCTGGCTATCTGCATCTTCACCTTCTGCTTTTCCGTGGCCTACAGAGTGAC	1320
421	LeuValCysLeuAlaIleCysIlePheThrPheCysPhePheArgGlyLeuGlnSerAsp	440
1321	CGAATACTATTTCACAGAACCTTTGTATCAACCTTTTCATTCGTGAATTTATTTTCCTA	1380
441	ArgAsnThrIleHisLysAsnLeuCysIleAsnLeuPheIleAlaGluPheIlePheLeu	460
1381	ATAGGCATTGATAAGACAAATATGGGATTCATGCCCAATATTTGCAGGACTTCTACAC	1440
461	IleGlyIleAspLysThrLysTyrAlaIleAlaCysProIlePheAlaGlyLeuLeuHis	480

【図 10】

1441	TTTTTCTTTTGGCAGCTTTTGGCTTGGATGTGCTAGAGGTGCGAGCTCTACCTAATG	1500
481	PhePhePheLeuAlaAlaPheAlaTrpMetCysLeuGluGlyValGlnLeuTyrLeuMet	500
1501	TTAGTTGAAGTTTGTGAAGTGAATATTCAGGAAATAATATTACTATGTGCTGTTAC	1560
501	LeuValGluValPheGluSerGluTyrSerArgLysLysTyrTyrValAlaGlyTyr	520
1561	TTGTTTCTCTGCCACAGTGTGGAGTTTCAGCTGCTATTGACTATTAAGAGCTATGGAACA	1620
521	LeuPheProAlaThrValValGlyValSerAlaAlaIleAspTyrLysSerTyrGlyThr	540
1621	GAAAAGCTTTCCTGGCTTCATGTTGATTAACCTATTATATGAGCTTCATGGAAGCTGTT	1680
541	GluLysAlaCysTrpLeuHisValAspAsnTyrPheIleTrpSerPheIleGlyProVal	560
1681	ACCTTCATTATCTGTCTAATATTATCTCTTGTGTGATCATTGTGCAAAATGTGAAG	1740
561	ThrPheIleIleLeuLeuAsnIleIlePheLeuValIleThrLeuCysLysMetValLys	580
1741	CATTCAAACACTTTGAAACCAAGATTCTAGCAGGTGGAAACATTAACTCTTGGGTGCTT	1800
581	HisSerAsnThrLeuLysProAspSerSerArgLeuGluAsnIleLysSerTrpValLeu	600
1801	GGCGCTTTCGCTCTCTGTCTCTCTTGGCTTCACCTGCTCTTGGGTGCTTTTATT	1860
601	GlyAlaPheAlaLeuLeuCysLeuLeuGlyLeuThrTrpSerPheGlyLeuLeuPheIle	620
1861	AATGAGGAGACTATTGTGTGATGGCATATCTCTCATAATTTAATGCTTTCCAGGAGTG	1920
621	AsnGluGluThrIleValMetAlaTyrLeuPheThrIlePheAsnAlaPheGlnGlyVal	640
1921	TTCAATTTTCATCTTTCACGTGCTCTCCAAAGAAAGTAGCAAAAGAAATATGCAAGTGC	1980
641	PheIlePheIlePheHisCysAlaLeuGlnLysLysValArgLysGluTyrGlyLysCys	660

【図11】

1981 TTCAGACACTCATACTGCTGTGGAGGCCTCCCACTGAGAGTCCCCACAGTTCAGTGAAG 2040
 661 PheArgHisSerTyrCysGlyGlyLeuProThrGluSerProHisSerSerValLys 680
 2041 GCATCAACCAACCAAGACAGTCTGCTATTCTCTCTGGCACACAGAGTGTATAGAAGA 2100
 681 AlaSerThrThrArgThrSerAlaArgTyrSerSerGlyThrGlnSerArgIleArgArg 700
 2101 ATGTGGAATGATACTGTGAGAAACAATCAGAACTCTCTTTTATCTCAGGTGACATCAAT 2160
 701 MetTrpAsnAspThrValArgLysGlnSerGluSerSerPheIleSerGlyAspIleAsn 720
 2161 AGCACTTCAACACCTTAATCAAGGAATGACTGGCAATTACCTACTAACAACCCCTCTTCTT 2220
 721 SerThrSerThrLeuAsnGlnGlyMetThrGlyAsnTyrLeuLeuThrAsnProLeuLeu 740
 2221 CGACCCACGGCACAACCCCTATAACACATTCCTGCTGCTGAAACAGTTGTATGTAAT 2280
 741 ArgProHisGlyThrAsnAsnProTyrAsnThrLeuLeuAlaGluThrValValCysAsn 760
 2281 GCCCTTCAGCTCCTGTATTTAACCTCACCAGGACATTCAGTGAACAATGCCAGGGATACA 2340
 761 AlaProSerAlaProValPheAsnSerProGlyHisSerLeuAsnAsnAlaArgAspThr 780
 2341 AGTGCCATGGATACTACCGCTAAATGGTAATTTTAAACAACAGCTACTGCTGCACAAG 2400
 781 SerAlaMetAspThrLeuProLeuAsnGlyAsnPheAsnAsnSerTyrSerLeuHisLys 800
 2401 GGTGACTATATGACAGCGTGCAAGTTGTGGACTGTGGACTAAGTCTGAATGATCTGCT 2460
 801 GlyAspTyrAsnAspSerValGlnValValAspCysGlyLeuSerLeuAsnAspThrAla 820

【図 12】

2461	TTTGAGAAATGATCAATTCAGAAATAGTGACAAACAATTACGGGGCAGCAGCAAGACT	2520
821	PheGluLysMetIleIleSerGluLeuValHisAsnAsnLeuArgGlySerSerLysThr	840
2521	CACAACTCGAGCTCAGCTACCGTACCAAGCTGATTTGGAGGTAGCAGCAGTGAAGAT	2580
841	HisAsnLeuGluLeuThrLeuProValLysProValIleGlySerSerSerGluAsp	860
2581	GATGCTATTGTGGCAGATGCTTCATCTTTAATGCACAGCGACACCCAGGGCTGGAGCTC	2640
861	AspAlaIleValAlaAspAlaSerSerLeuMetHisSerAspAsnProGlyLeuGluLeu	880
2641	CATCACAAGAACTCGAGGCCACCTATTCTCCTCAGCGGACTACTCCCTTCTGTACCAA	2700
881	HisHisLysGluLeuGluAlaProLeuIleProGlnArgThrHisSerLeuLeuTyrGln	900
2701	CCCCAGAGAAGTGAAGTCCGAGGGAACTGACAGCTATGTCTCCCACTGACAGCAGAG	2760
901	ProGlnLysLysValLysSerGluGlyThrAspSerTyrValSerGlnLeuThrAlaGlu	920
2761	GCTGAAGATCACCCTACAGTCCCCCAACAGAGACTCTCTTTATACAGCATGCCCAATCTT	2820
921	AlaGluaspHisLeuGlnSerProAsnArgAspSerLeuTyrThrSerMetProAsnLeu	940
2821	AGAGACTCTCCCTATCCGGAGAGCAGCCCTGACATGGAGAAGACCTCTCTCCCTCCAGG	2880
941	ArgAspSerProTyrProGluSerSerProAspMetGluGluAspLeuSerProSerArg	960
2881	AGGAGTGAGAATGAGGACATTTACTATAAAGCATGCCAAATCTTGGAGCTGCCCATCAG	2940
961	ArgSerGluAsnGluAspIleTyrTyrLysSerMetProAsnLeuGlyAlaGlyHisGln	980

【図 13】

2941	CTTCAGATGTGCTACCAAGATCAGAGGGCAATAGTATGTTATATAATCCCATTAAC	3000
981	LeuGlnMetCysTyrGlnIleSerArgGlyAsnSerAspGlyTyrIleIleProIleAsn	1000
3001	AAAGAAGGGTGTATTCAGAGGAGATGTTAGAGAGGACAAATGCAGCTGGTTACAAGT	3060
1001	LysGluGlyCysIleProGluGlyAspValArgGluGlyGlnMetGlnLeuValThrSer	1020
3061	CTTTAATCATACAGCTAAGGAATTCCAGGGCCACATGCCGAGTATTATAATAATAAGACA	3120
1021	Leu***	1022
3121	CCATTGGCCTGACGAGCTCCCTCAAACCTCTGCTTGAAGAGATGACTCTTGACCTGTGGT	3180
1022		1022
3181	TCTCTGGTGTAAAAAAGATGACTGAACCTTGCAGTCTCTGTGAATTTTATAAAACATACA	3240
1022		1022
3241	AAACCTTTGTATATACACAGAGTATACTAAAGTGAATTTATTGTTACAAAGAAAAGAGAT	3300
1022		1022
3301	GCCAGCCAGGTATTTTAAGATTCTGCTGCTGTTTAGAGAAATTGTGAAACAAGCAAAACA	3360
1022		1022
3361	AAACTTCCAGCCATTTTACTGCAGCAGTCTGTGAACTAAATTTGTAAATATGGCTGCAC	3420
1022		1022

【 図 1 4 】

3421	CATTTTGTAGGCCCTGCTGTTTATATATACAGACGTAGGCTTTAAATCCTGTGGAC	3480
1022		1022
3481	AAATTACGTACCTTACTATTCTCTGACAGACCTTGGAAAGCAGAGAGATATCTGCA	3540
1022		1022
3541	TCAGTTTGCAGTTCACTGCAATCTTTTACATTAAGCAAGATGCAAAACATGCTTAAC	3600
1022		1022
3601	CACTAGCAATCAAGCCACAGGCCCTTATTTCATATGTTTCTCTCACTGTACAACTAT	3660
1022		1022
3661	TCTCAAGAAAANUGGCTAAGAAATTAATTTTGTCTATTGCTAGGGTAAATAATAC	3720
1022		1022
3721	ATTGTGTCCAACTGAATATATAATGTCAATAAATAATTTAAAGAGTGAAGAAATAT	3780
1022		1022
3781	TGTGAAAGCTCTTGTGTCACATGTTATGAAANGTTTTTTTCTTACACTTTGTCTGGA	3840
1022		1022
3841	AGTTCTACTCATTTTCACCTCTTTTCCACGTATACAGTGTCTGCTTTGACAAAGTTAG	3900
1022		1022
3901	TCTTTATTACTTACATTTAAATTTCTTATTTCCAAAGAAAGTGTTTTATGGGAGAAAC	3960

【図 1 5】

1022		1022
3961	AAACTCTTTGAAGCCAGTTATGTCATGCCCTTGCACAAAGTGATGAATCTAGAAAAGAT	4020
1022		1022
4021	TGTGTGTCACCCCTGTTTATTCTTGAACAGAGGGCAAGAGGGCCTGGGCACCTTCTCAC	4080
1022		1022
4081	AAACTTTCTAGTGAACAAAAGGTGCCTATTCTTTTAAATAAATAAACAATAAA	4140
1022		1022
4141	TATTACTCTTCCATATTCCTTCTGCTATATTAGTAATTAATTTTATGATAAAGT	4200
1022		1022
4201	TCTAATGAATGTAAATGTGTTTCAGCAAAATTCCTTTTTTTCATCCCTTGTGATAA	4260
1022		1022
4261	CCTGTTAATAATGAGCCCATCACTAATATCCAGTGTAAGTTTAAACGGTTTGACAGTA	4320
1022		1022
4321	ATAAATGTGAATTTTTTCAAGT	4343
1022		1022

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 アゴニスト／アンタゴニストのスクリーニング等に有用な新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の提供。

【解決手段】 ヒトヒト脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該レセプター蛋白質をコードするDNA、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニングで得られる化合物またはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体など。

【効果】 本発明のヒト脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはそれをコードするDNAは、①リガンドの決定、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬、⑦トランスジェニック動物の作製、⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして有用である。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 596175810

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2-3

【氏名又は名称】 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】 100073955

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100077012

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島 2 丁目 1 番 2 7 号 桜橋千代

田ビル 8 階岩谷国際特許事務所

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目 1 7 番 8 5 号

武田薬品工業株式会社 大阪工場内

【氏名又は名称】 内山 務

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成10年 8月17日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成10年特許願第225060号

【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質および そのDNA

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代表者】 武田 國男

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 受託証

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 受託証（写） 2

国際様式 INTERNATIONAL FORM



〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約〕

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される。

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名(名称) 武田薬品工業株式会社
寄託者 代表者 武田 國男

29815900007



あて名 〒

殿

大阪市中央区道修町西丁目1番1号

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

Escherichia coli JM109/pHX05006

(受託番号)

FERM BP- 6433

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1個の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☒ 科学的性質
- ☒ 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成10年 7月21日(原寄託日)に受領した1個の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、
年 月 日(原寄託日)に1個の微生物を受領した。
そして、
年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency for Industrial Science and Technology

所長 大賀 俊

Dr. Shun Ohgaki Director-General

あて名: 日本国茨城県つくば市大賀1-3 (郵便番号305-8566)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

平成10年(1998) 7月21日



国際様式 INTERNATIONAL FORM

SUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 武田薬品工業株式会社
代表者 武田 國男
寄託者 あて名 〒 大阪市中央区道修町四丁目1番1号

1. 微生物の表示 (寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli JM109/pHK05490		(受託番号) FERM BP- 6456
2. 科学的性質及び分類学上の位置 1種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置		
3. 受領及び受託 本国際寄託当局は、平成10年 8月 7日(原寄託日)に受領した1種の微生物を受託する。		
4. 移管請求の受領 本国際寄託当局は、 年 月 日(原寄託日)に1種の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。		
5. 国際寄託当局 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology 名称: 生命工学研究所 所長 大塚 信 Dr. Shin Ohtsuka Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市大塚1-3-1 (郵便番号305-8566) 1-3, Higashi-Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成10年(1998) 8月 7日		

【書類名】	職権訂正データ
【訂正書類】	手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】	
【識別番号】	000002934
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
【氏名又は名称】	武田薬品工業株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100073955
【住所又は居所】	大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社大阪工場内
【氏名又は名称】	朝日奈 忠夫
【提出された物件の記事】	
【提出物件名】	受託証（写） 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596175810]

1. 変更年月日 1996年12月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県木更津市矢那1532-3

氏 名 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日	1992年 1月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名	武田薬品工業株式会社